(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 589 306**

(51) Int. CI.:

C07C 229/22 (2006.01)
C07K 7/52 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2013 PCT/EP2013/002084**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009025**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2013 E 13737145 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2872479**

(54) Título: **Métodos para sintetizar un elemento estructural de amatoxinas y amatoxinas**

(30) Prioridad:

13.07.2012 EP 12005173

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.11.2016

(73) Titular/es:

HEIDELBERG PHARMA GMBH (100.0%)
Schriesheimer Strasse 101
68526 Ladenburg, DE

(72) Inventor/es:

LUTZ, CHRISTIAN;
MUELLER, CHRISTOPH y
SIMON, WERNER

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

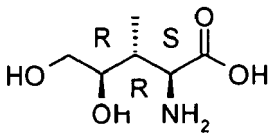
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para sintetizar un elemento estructural de amatoxinas y amatoxinas

Campo de la invención

La invención se refiere a métodos novedosos para sintetizar un sintón para γ,δ-dihidroxiisoleucina 1 (n.º CAS 55399-94-5] como elemento estructural para la síntesis de amatoxinas, y para métodos novedosos para sintetizar amatoxinas usando tal elemento estructural.



1
[55399-94-5]

Antecedentes de la invención

Las amatoxinas son péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos, que se encuentran en hongos de *Amanita phalloides* (véase la figura 1). Las amatoxinas inhiben específicamente la ARN-polimerasa II dependiente de ADN de células de mamíferos y, de ese modo, también la transcripción y biosíntesis de proteínas de las células afectadas. La inhibición de la transcripción en una célula provoca la detención del crecimiento y la proliferación. Aunque están unidos de manera no covalente, el complejo entre amanitina y ARN-polimerasa II es muy fuerte (K_D = 3 nM). La disociación de la amanitina a partir de la enzima es un proceso muy lento, haciendo, por tanto, improbable la recuperación de una célula afectada. Cuando la inhibición de la transcripción dura demasiado, la célula experimentará muerte celular programada (apoptosis).

El uso de amatoxinas como restos citotóxicos para terapia tumoral ya se había explorado en 1981 acoplando un anticuerpo anti-Thy-1.2 a α-amanitina usando un ligador unido al anillo de indol de Trp (aminoácido 4; véase la figura 1) mediante diazotación (Davis & Preston, Science 1981, 213, 1385-1388). Davis y Preston identificaron el sitio de unión como la posición 7'. Morris y Venton demostraron también que la sustitución en la posición 7' da como resultado un derivado, que mantiene la actividad citotóxica (Morris & Venton, Int. J. Peptide Protein Res. 1983, 21 419-430).

La solicitud de patente EP 1859811 A1 (publicada el 28 de noviembre de 2007) describe conjugados, en los que el átomo de C γ del aminoácido 1 de amatoxina de β-amanitina se acopló directamente, es decir, sin una estructura de ligador, a albúmina o a anticuerpo monoclonal HEA125, OKT3 o PA-1. Además, se mostró el efecto inhibidor de estos conjugados sobre la proliferación de células de cáncer de mama (MCF-7), células de linfoma de Burkitt (Raji) y células de linfoma T (Jurkat). Se sugirió el uso de ligadores, incluyendo ligadores que comprenden elementos tales como amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, restos de hidrocarburos y similares, pero realmente no se mostraron tales constructos, y no se proporcionaron más detalles, tales como sitios de unión en las amatoxinas.

Las solicitudes de patente WO 2010/115629 y WO 2010/115630 (ambas publicadas el 14 de octubre de 2010) describen conjugados, donde los anticuerpos, tales como anticuerpos anti-EpCAM tales como el anticuerpo humanizado huHEA125, se acoplan a amatoxinas mediante (i) el átomo de C γ del aminoácido 1 de amatoxina, (ii) el átomo de C en 6' del aminoácido 4 de amatoxina, o (iii) mediante el átomo de C δ del aminoácido 3 de amatoxina, en cada caso o bien directamente o bien mediante un ligador entre el anticuerpo y las amatoxinas. Los ligadores sugeridos comprenden elementos tales como amida, éster, éter, tioéter, disulfuro, urea, tiourea, restos de hidrocarburos y similares. Además, se mostraron los efectos inhibidores de estos conjugados sobre la proliferación de células de cáncer de mama (línea celular MCF-7), carcinoma pancreático (línea celular Capan-1), cáncer de colon (línea celular Colo205) y colangiocarcinoma (línea celular OZ).

Las amatoxinas pueden aislarse a partir de cuerpos fructíferos de hongos de *Amanita phalloides* recogidos, o a partir de cultivos puros (Zhang P, Chen Z, Hu J, Wei B, Zhang Z, y Hu W, Production and characterization of Amanitin toxins from a pure culture of Amanita exitialis, FEMS Microbiol Lett. 15 de nov. de 2005; 252(2):223-8. Pub. elec. 15 de sept. de 2005). Sin embargo, las cantidades de amatoxinas que pueden obtenerse son más bien bajas (en el intervalo de aproximadamente 0,3-3 mg/g de materia seca a partir de cuerpos fructíferos naturales, y aproximadamente el 10% de los mismos a partir de cultivo puro) y la flexibilidad para modificar adicionalmente las variantes de amatoxinas que se producen de manera natural está limitada (véanse las referencias comentadas en los párrafos [003]-[005] y las referencias citadas en los mismos).

Alternativamente, las amatoxinas pueden obtenerse a partir de fermentación usando un basidiomiceto (Muraoka S, y Shinozawa T., Effective production of amanitins by two-step cultivation of the basidiomycete, Galerina fasciculata

GF-060, J Biosci Bioeng. 2000; 89(1):73-6; el rendimiento notificado fue aproximadamente 5 mg/l de cultivo) o *A. fissa* (Guo XW, Wang GL, y Gong JH, Culture conditions and analysis of amanitins on Amanita spissa, Wei Sheng Wu Xue Bao. Jun. de 2006; 46(3):373-8; el rendimiento notificado fue aproximadamente 30 μg/l de cultivo). De nuevo, los rendimientos son bajos y la flexibilidad para modificar adicionalmente las variantes de amatoxinas que se producen de manera natural está también limitada.

Finalmente, se han preparado amatoxinas por síntesis parcial o completa (por ejemplo, Zanotti G, Möhringer C, y Wieland T., Synthesis of analogues of amaninamide, an amatoxin from the white Amanita virosa mushroom, Int J Pept Protein Res. Oct. de 1987; 30(4):450-9; Zanotti G, Wieland T, Benedetti E, Di Blasio B, Pavone V, y Pedone C., Structure-toxicity relationships in the amatoxin series. Synthesis of S-deoxy[gamma(R)-hydroxy-Ile3]-amaninamide, its crystal and molecular structure and inhibitory efficiency, Int J Pept Protein Res. Sept. de 1989; 34(3):222-8; Zanotti G, Petersen G, y Wieland T., Structure-toxicity relationships in the amatoxin series. Structural variations of side chain 3 and inhibition of RNA polimerase II, Int J Pept Protein Res. Dic.de 1992; 40(6):551-8).

Aunque el uso de rutas completamente sintéticas para dar amatoxinas puede ofrecer el suministro de cantidades más grandes de amatoxinas requeridas para usos terapéuticos y puede ofrecer la construcción de una variedad de variantes de amatoxinas novedosas usando materiales de partida adecuados como elementos estructurales, no se ha notificado hasta la fecha un enfoque completamente sintéticos para dar las amatoxinas más relevantes, α-amanitina y β-amanitina, así como amanina y amaninamida. Esto puede atribuirse, al menos en parte, al hecho de que un elemento estructural esencial, γ,δ-dihidroxiisoleucina 1 o un sintón para la misma, no estaba aún disponible hasta la fecha como diastereómero puro.

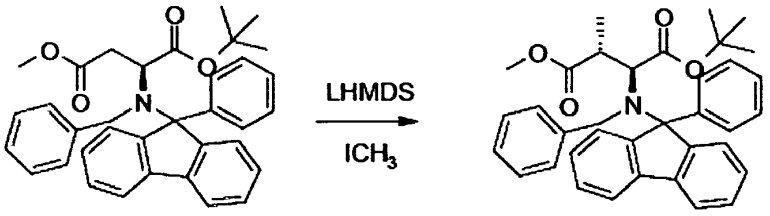
Objeto de la invención

Por tanto, había una alta necesidad en la técnica anterior de obtener γ,δ-dihidroxiisoleucina 1 o un sintón para la misma, como elemento estructural para la síntesis de amatoxinas, y de identificar un método para la producción de 1, o de un sintón para la misma. Además, había una alta necesidad en la técnica anterior de identificar un método alternativo para sintetizar amatoxinas.

Sumario de la invención

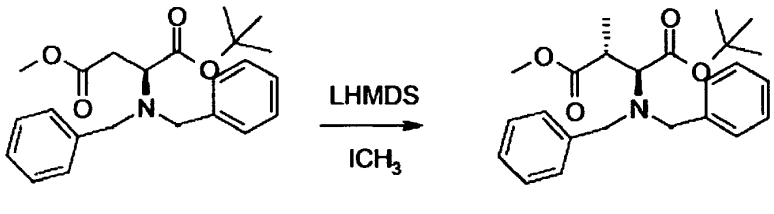
La presente invención se basa en la observación inesperada de que γ,δ-dihidroxiisoleucina 1 o un sintón para la misma, pueden obtenerse en un procedimiento de múltiples etapas, en el que la metilación regioselectiva de un derivado de ácido aspártico protegido apropiadamente es la etapa clave.

Por tanto, en un aspecto la presente invención se refiere a un método para la síntesis de γ,δ-dihidroxiisoleucina 1 o de un sintón para el compuesto 1, que comprende la etapa de metilación del compuesto 3, en particular con yoduro de metilo en presencia de bis(trimetilsilil)amida de litio (LHMDS).



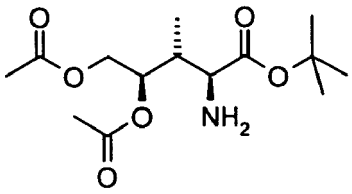
3 **2**

En un aspecto alternativo, la presente invención se refiere a un método para la síntesis de γ,δ-dihidroxiisoleucina 1 o de un sintón para el compuesto 1, que comprende la etapa de metilar el compuesto 3* (que tiene un segundo grupo de protección de bencilo en el átomo de nitrógeno en vez del grupo fenilfluorenilo en el compuesto 3), en particular con yoduro de metilo en presencia de bis(trimetilsilil)amida de litio (LHMDS).



3* **2***

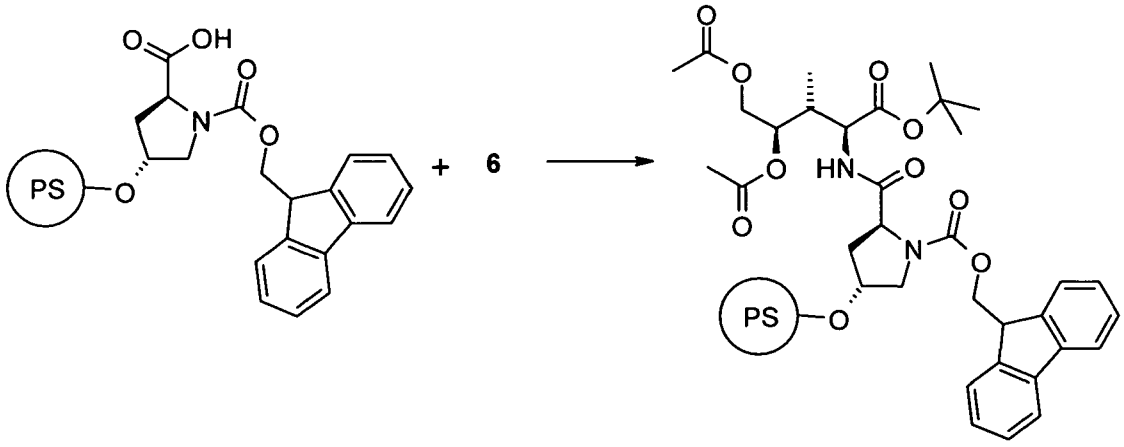
En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al compuesto 6.



6

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende el compuesto 6, y al menos un reactivo adicional para la síntesis de amatoxinas o precursores de las mismas.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar una amatoxina o molécula precursora para la misma, que comprende la etapa de acoplar el compuesto 6 a hidroxiprolina, haciendo reaccionar en particular el compuesto 6 con una resina precargada con hidroxiprolina (PS) L.



L **G**

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra las fórmulas estructurales de diferentes amatoxinas. Los números en negrita (1 a 8) designan la numeración convencional de los ocho aminoácidos que forman la amatoxina. También se muestran las designaciones convencionales de los átomos en los aminoácidos 1, 3 y 4 (letras griegas α a γ, letras griegas α a δ, y números de 1' a 7', respectivamente).

La figura 2 muestra los espectros de ^{1}H- y ^{13}C-RMN, que muestran una razón diastereomérica de 70:30 del compuesto 6.

La figura 3 muestra un esquema de síntesis general de la síntesis de amatoxinas.

Descripción detallada de la invención

Antes de que la presente invención se describa en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir únicamente realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que se limitará únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica.

Preferiblemente, los términos usados en el presente documento se definen tal como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kölbl, H. edición. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

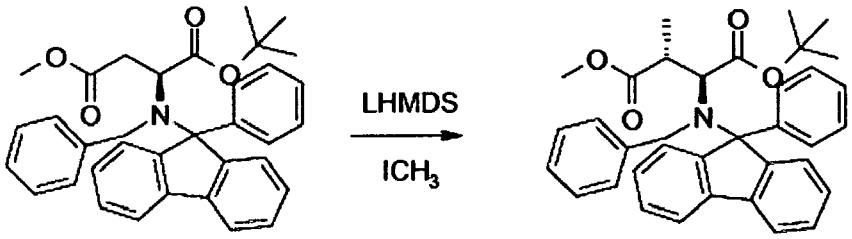
A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra

cosa, la palabra “comprender”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un número entero, composición o etapa determinado o grupo de número enteros o etapas, mientras que cualquier número entero, composición o etapa adicional o grupo de número enteros, composiciones o etapas pueden estar también presentes opcionalmente, incluyendo realizaciones, donde ningún número entero adicional, composición o etapa o grupo de número enteros, composiciones o etapas están presentes. En tales últimas realizaciones, el término “que comprende” se usa simultáneamente con “que consiste en”.

Varios documentos se citan a lo largo del texto de esta memoria descriptiva. Cada uno de los documentos citados en el presente documento (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, especificaciones del fabricante, instrucciones, presentaciones de secuencias de número de registro de GenBank etc.), tanto anteriormente como a continuación, se incorporan por el presente documento como referencia en su totalidad en la medida de lo posible según la ley de patentes respectiva. Nada en el presente documento ha de interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder a tal divulgación en virtud de invención anterior.

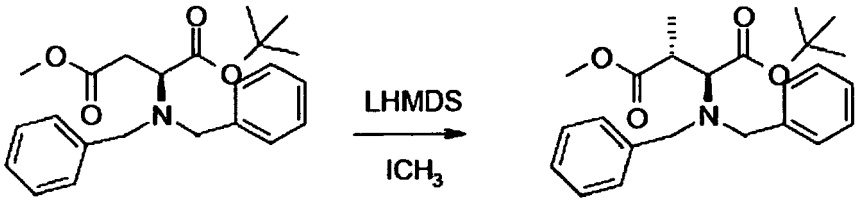
La presente invención se describirá ahora adicionalmente. En los siguientes pasajes se definen en más detalle diferentes aspectos de la invención. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a no ser que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

Por tanto, en un aspecto la presente invención se refiere a un método para la síntesis de γ,δ-dihidroxiisoleucina 1 o de un sintón para el compuesto 1, que comprende la etapa de metilar el compuesto 3, en particular con yoduro de metilo en presencia de bis(trimetilsilil)amida de litio (LHMDS).



3 **2**

En un aspecto alternativo, la presente invención se refiere a un método para la síntesis de γ,δ-dihidroxiisoleucina 1 o de un sintón para el compuesto 1, que comprende la etapa de metilar el compuesto 3* (que tiene un segundo grupo de protección de bencilo en el átomo de nitrógeno en vez del grupo fenilfluorenilo en el compuesto 3), en particular con yoduro de metilo en presencia de bis(trimetilsilil)amida de litio (LHMDS).



3* **2***

En el contexto de la presente invención, el término “sintón” se refiere a un compuesto que es, o puede usarse como, un equivalente sintético para un compuesto de interés particular en una reacción química. Esta definición incluye compuestos en los que un resto del compuesto de interés que sería lábil o reactivo en las condiciones que van a usarse en dicha reacción química está protegido o enmascarado por un grupo de protección apropiado que puede escindirse tras dicha reacción química.

En una realización particular, la reacción se realiza a una temperatura de entre aproximadamente -10ºC y aproximadamente -80ºC en un éter durante entre aproximadamente 12 y aproximadamente 20 horas, en particular durante aproximadamente 16 horas. En una realización particular, la reacción se realiza a -20ºC y en tetrahidrofurano como disolvente. En realizaciones particulares, se obtiene una pureza diastereomérica mayor de 30:1, en particular mayor de 40:1, en particular de aproximadamente 50:1.

En el contexto de la presente invención, el término “aproximadamente” significa entre el 90% y el 110% de un valor o

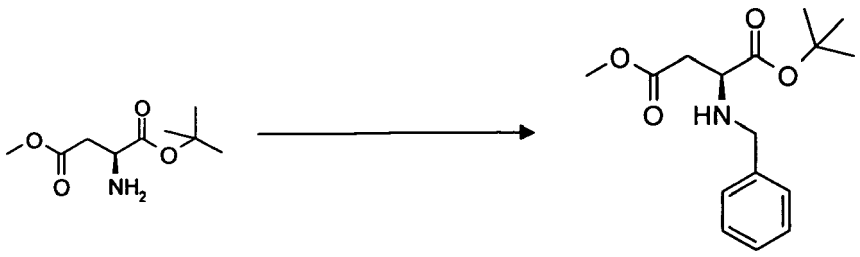
intervalo dado.

En una realización particular, el método comprende además una o más de las siguientes etapas para sintetizar el compuesto 3:

(a) reacción de éster monometílico de ácido L-aspártico A con 2-metilpropeno para crear el compuesto B;

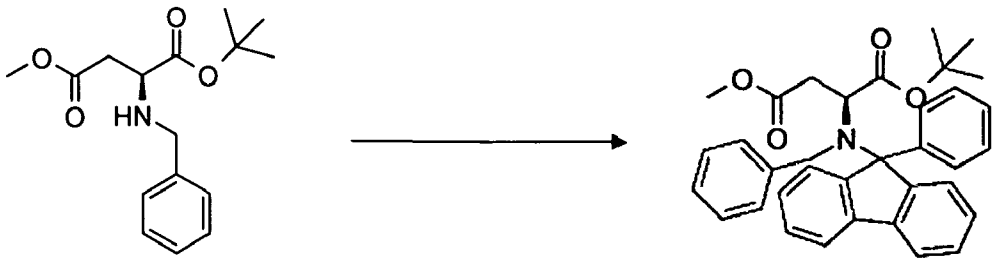
A B

(b) reacción de B con benzaldehído para crear el compuesto C;



B C

(c) reacción de C con bromuro de fenilfluoreno para crear el compuesto 3.



C 3

En una realización del aspecto alternativo, el método comprende además una o más de las siguientes etapas para sintetizar el compuesto 3*:

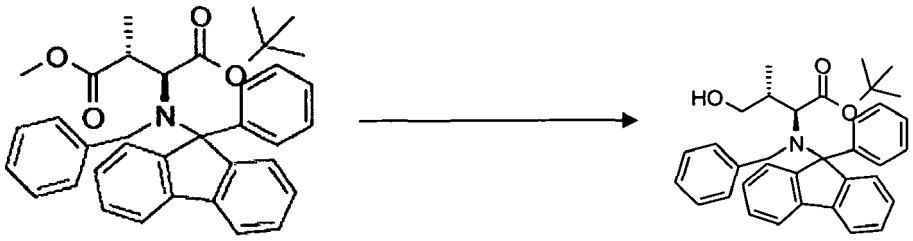
(a) reacción de éster monometílico de ácido L-aspártico A con 2-metilpropeno para crear el compuesto B;

(b) reacción de B con benzaldehído para crear el compuesto C;

(c) reacción de C con bromuro de bencilo para crear el compuesto 3*.

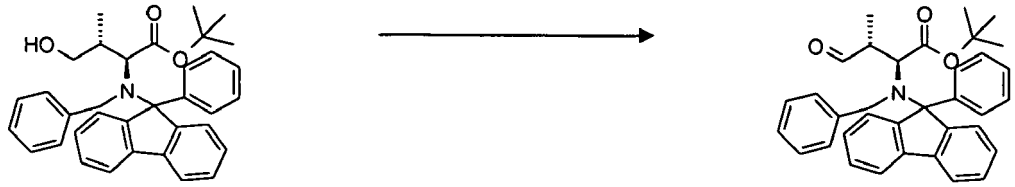
En una realización particular, el método comprende además una o más de las siguientes etapas:

(a) reducción del compuesto 2, en particular con hidruro de diisobutilaluminio (DiBAl-H) para crear el compuesto D;



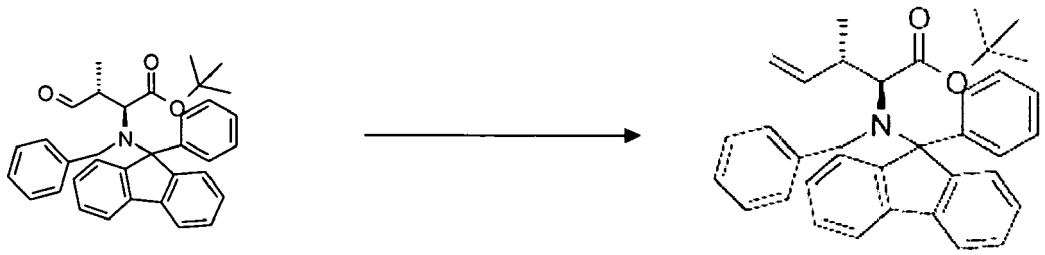
2 D

(b) oxidación del compuesto de hidroxilo D, en particular usando una oxidación de Swern, para crear el compuesto E;



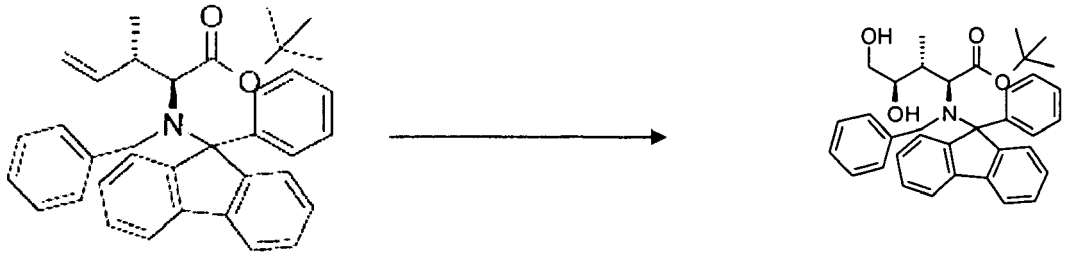
D E

(c) conversión de E, en particular en condiciones de una reacción de Wittig, para crear el compuesto 4;



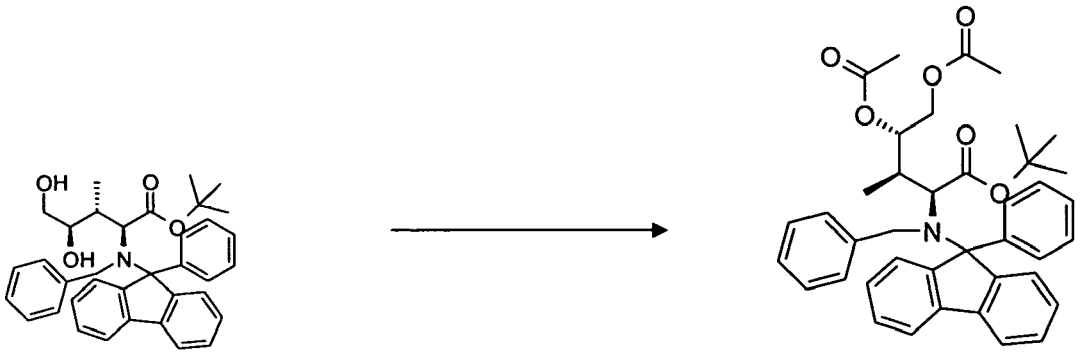
E 4

(d) conversión de 4, en particular en condiciones de una oxidación de Sharpless, para crear el compuesto F;



4 F

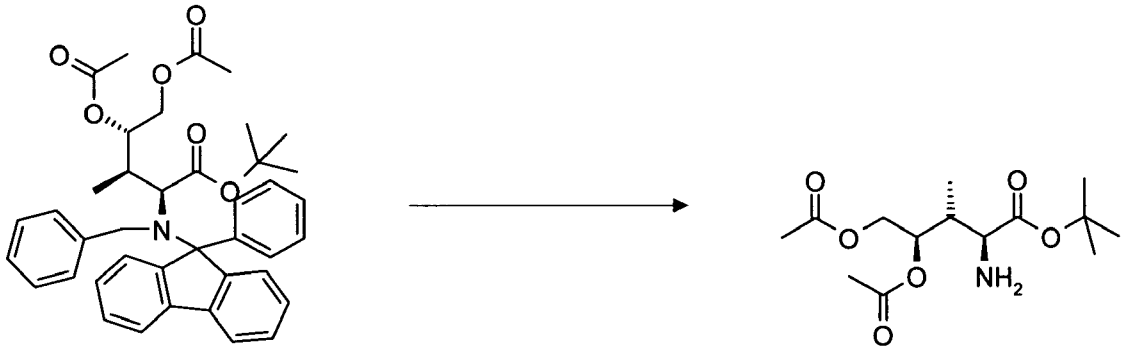
(e) conversión de F, en particular en condiciones de esterificación catalíticas, para crear el compuesto 5;



F 5

y

(f) desprotección de N de 5, en particular usando hidrogenación catalizada por paladio, para crear el compuesto 6.



5 6

En una realización particular del aspecto alternativo, el método comprende además una o más de las siguientes etapas:

(a) reducción del compuesto 2*, en particular con hidruro de diisobutilaluminio (DiBAI-H) para crear el compuesto D* (que tiene un segundo grupo de protección de bencilo en el átomo de nitrógeno en vez del grupo fenilfluorenilo en el compuesto D);

(b) oxidación del compuesto de hidroxilo D*, en particular usando una oxidación de Swern, para crear el compuesto E* (que tiene un segundo grupo de protección de bencilo en el átomo de nitrógeno en vez del grupo fenilfluorenilo en el compuesto E);

(c) conversión de E*, en particular en condiciones de una reacción de Wittig, para crear el compuesto 4* (que tiene un segundo grupo de protección de bencilo en el átomo de nitrógeno en vez del grupo fenilfluorenilo en el compuesto 4);

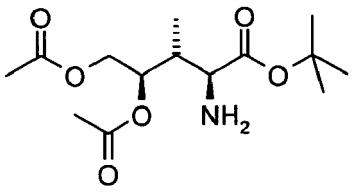
(d) conversión de 4*, en particular en condiciones de una oxidación de Sharpless, para crear el compuesto F* (que tiene un segundo grupo de protección de bencilo en el átomo de nitrógeno en vez del grupo fenilfluorenilo en el compuesto F);

(e) conversión de F*, en particular en condiciones de esterificación catalíticas, para crear el compuesto 5* (que tiene un segundo grupo de protección de bencilo en el átomo de nitrógeno en vez del grupo fenilfluorenilo en el compuesto 5); y

(f) desprotección de N de 5*, en particular usando hidrogenación catalizada por paladio, para crear el compuesto 6.

En una realización particular, el método comprende además la etapa de aislar y purificar el compuesto 6. En una realización particular, el compuesto 6 se purifica como clorhidrato usando precipitación y/o purificación cromatográfica.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al compuesto 6.



6

En una realización particular, el compuesto 6 tiene una pureza mayor del 90%, en particular mayor del 95%.

En el contexto de la presente invención, el término "pureza" se refiere a la cantidad total del compuesto 6 y de sus diaestereoisómeros que están presentes. Una pureza mayor del 90%, por ejemplo, significa que en 1 g de una composición que comprende el compuesto 6, hay más del 90%, es decir más de 900 mg, del compuesto 6 y/o sus estereoisómeros. La parte restante, es decir las impurezas, puede incluir material de partida sin reaccionar y otros reactivos, disolventes, productos de escisión y/o productos secundarios.

En una realización particular, una composición que comprende el compuesto 6 con una pureza mayor del 90% comprende más de 100 mg del compuesto 6.

En una realización particular, el compuesto 6 tiene una pureza diastereomérica mayor de 70:30.

En el contexto de la presente invención, el término "pureza diastereomérica" se refiere a la razón de la cantidad de compuesto 6 que está presente en una composición que comprende el compuesto 6 con respecto a las cantidades de sus diaestereoisómeros que están presentes en dicha composición. Una pureza diastereomérica mayor de 70:30, por ejemplo, significa que más del 70% de la cantidad total de dihidroxiisoleucinas protegidas en una composición que comprende el compuesto 6 y de sus diastereómeros es el compuesto 6, mientras que la cantidad total de todos los diaestereoisómeros del compuesto 6 es correspondientemente menor del 30%.

En una realización particular, una composición que comprende el compuesto 6 con una pureza diastereomérica mayor de 70:30 comprende más de 100 mg del compuesto 6.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende el compuesto 6, en particular un kit que comprende al menos 100 mg del compuesto 6, y al menos un reactivo adicional para la síntesis de amatoxinas o precursores de las mismas.

En realizaciones particulares, el compuesto 6 en el kit tiene una pureza mayor del 90%, en particular mayor del 95%, y/o una pureza diastereomérica mayor de 70:30.

En realizaciones particulares, dicho al menos un reactivo adicional se selecciona de la lista de:

(i) una resina, en particular una resina seleccionada del grupo de: una resina de Merrifield; una resina de amida de Rink; y una resina de THP;

(ii) una hidroxiprolina protegida, en particular O-alil-hidroxiprolina protegida con fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) (FmocHypOAll);

(iii) una asparagina protegida, en particular N-tritil-asparagina protegida con Fmoc (Fmoc(N-Tri)AsnOH);

(iv) un dipéptido Cys-Trp protegido, en particular dipéptido Cys-Trp protegido con Fmoc con grupos de protección de -SH y -OH (FmocCys(S-2-((o-NO_2Ph)SO_2Trp-O-alil))]OH);

(v) una glicina protegida, en particular glicina protegida con Fmoc (FmocGly);

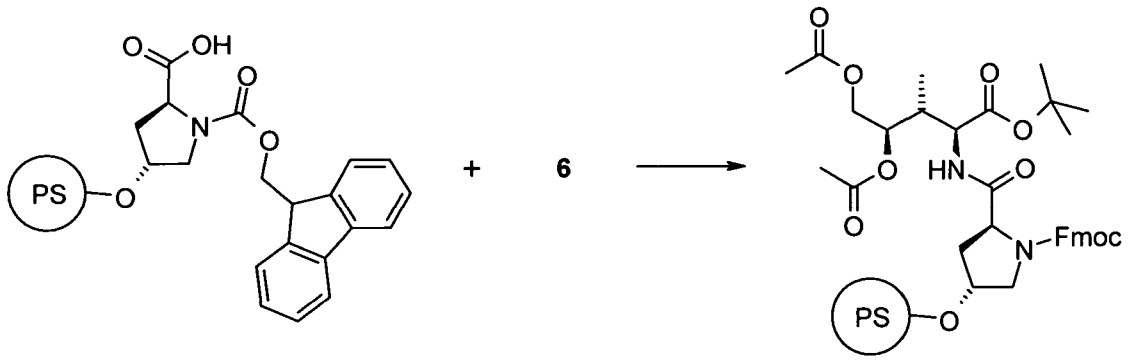
(vi) una isoleucina protegida, en particular isoleucina protegida con Fmoc (FmocIle);

(vii) un reactivo de acoplamiento peptídico, en particular un reactivo de acoplamiento peptídico seleccionado del grupo de: tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU); hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP); y hexafluorofosfato de o-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU); y

(viii) una amina terciaria, en particular N,N-diisopropiletilamina (DiPEA).

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar una amatoxina, o molécula

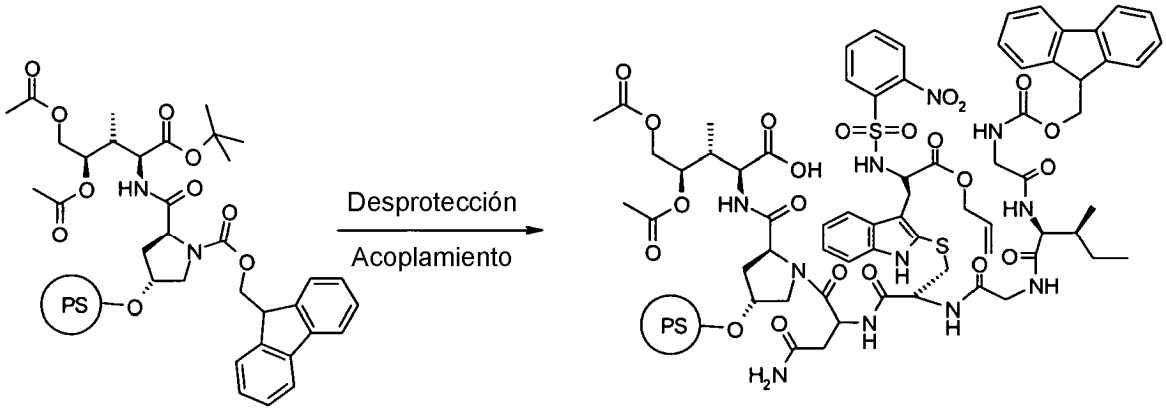
precursora de la misma, que comprende la etapa de (a) acoplar el compuesto 6 a hidroxiprolina, haciendo reaccionar en particular el compuesto 6 con una resina precargada con hidroxiprolina, en particular acoplando el compuesto 6 al extremo terminal C libre de FmocHypOH inmovilizado sobre una resina L, por ejemplo, una resina de tetrahidropiranilo (THP).



L **6**

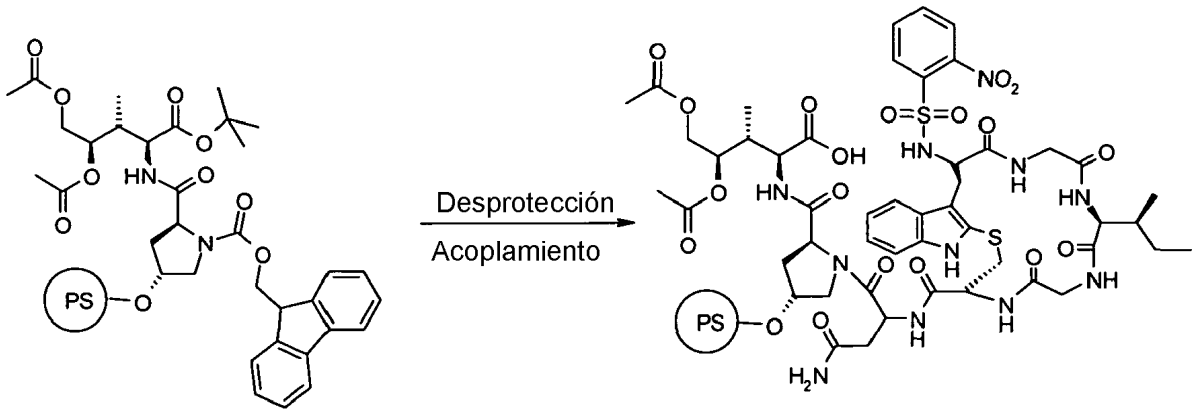
En realizaciones particulares, los aminoácidos restantes se acoplan entonces mediante una estrategia de síntesis N-terminal. En tales realizaciones particulares, el método de la presente invención comprende adicionalmente una o más de las siguientes etapas:

(b) desprotección de N con Fmoc iterativa y acoplamiento de G con Fmoc-(N-Tri)Asn OH; FmocCys(S-2-((o-NO_2Ph)SO_2Trp-O-alil))]OH, Fmoc-Gly OH, Fmoc-Ile OH, Fmoc-Gly OH para crear el compuesto **H**:



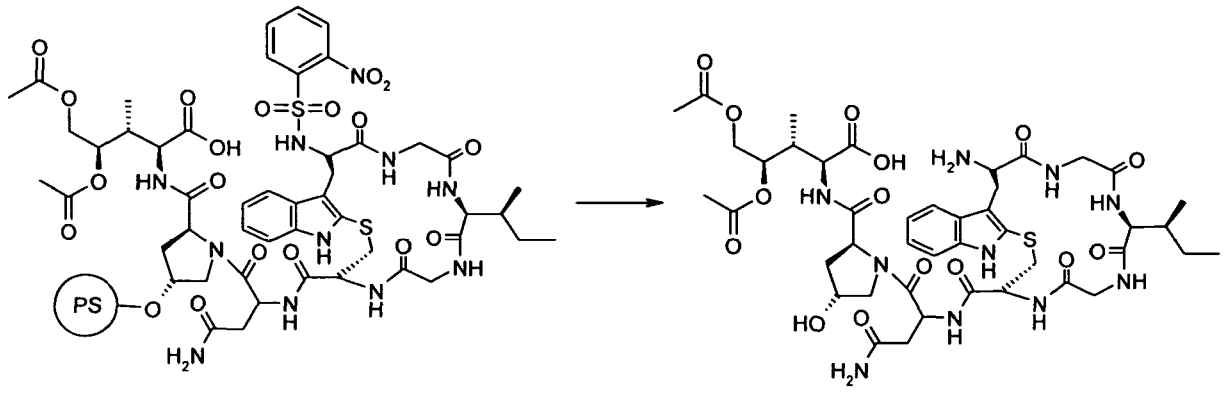
G **H**

(c) desprotección de O-alilo y N con Fmoc de H seguido por ciclación para crear el compuesto I (cierre del anillo B):



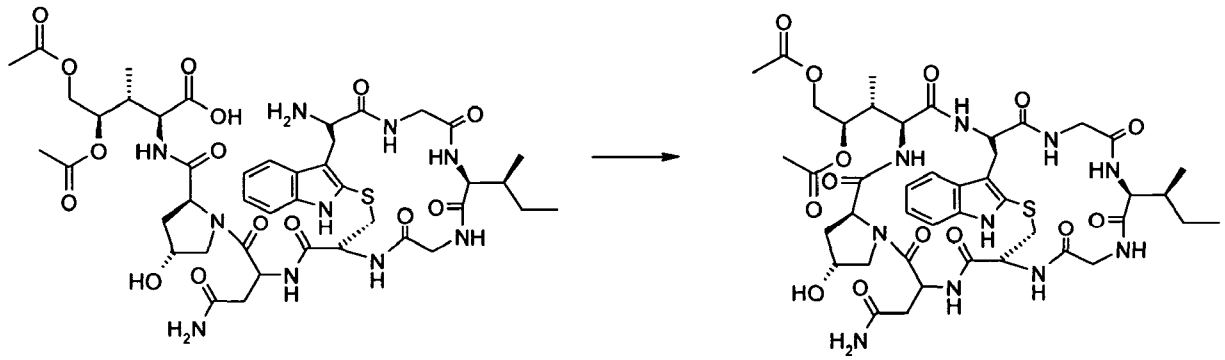
H **I**

(d) desprotección de N con 2-nitro-arilsulfonamida y separación de I de la resina para crear el compuesto J:



I J

(e) ciclación en fase de disolución de J creando el derivado de amanitina K:

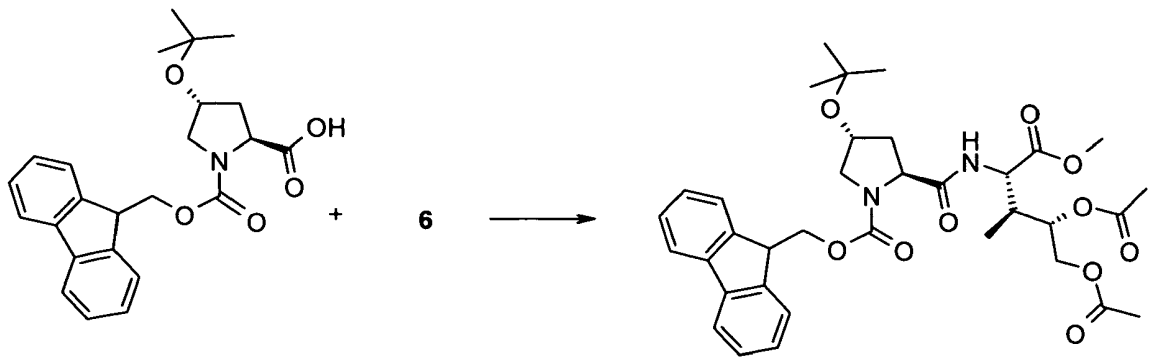


J K

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar una amatoxina, o molécula precursora para la misma, en disolución.

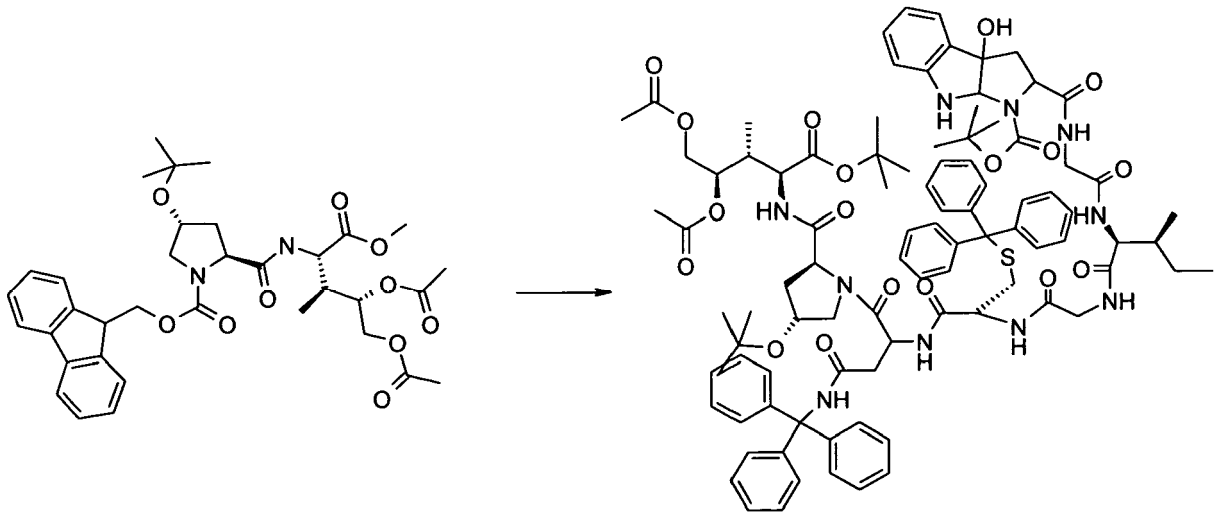
En determinadas realizaciones, tal método comprende una o más de las siguientes etapas:

(a) acoplamiento del compuesto 6 con hidroxiprolina, haciendo reaccionar en particular el compuesto 6 con una hidroxiprolina, acoplando en particular el compuesto 6 al extremo terminal C libre de Fmoc (O^tBu) HypOH;



L M

(b) desprotección de N con Fmoc iterativa y acoplamiento de M con Fmoc-(N-Tri)Asn OH; Fmoc-(S-Tri)Cys OH, Fmoc-Gly OH, Fmoc-Ile OH, Fmoc-Gly OH y N-Boc-HPI OH para crear el compuesto N;



M N

(c) desprotección ácida de grupos de protección de N y S-tritilo, O-terc-butilo y N-tercbutiloxicarbonilo y cierre de anillo *in situ* mediante una reacción de Savige-Fontana (Savige & Fontana, Int J Pept Protein Res. 15 (1980) 102-12) produciendo el compuesto J.

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para sintetizar una amatoxina, o molécula precursora para la misma, en disolución, que comprende la etapa acoplar el compuesto 6 a hidroxiprolina, haciendo reaccionar en particular el compuesto 6 con una hidroxiprolina, acoplando en particular el compuesto 6 al extremo terminal C libre de Fmoc (O^tBu) HypOH.

En realizaciones particulares, la amatoxina es una amatoxina con un resto de dihidroxiisoleucina como aminoácido 3 (véase la figura 1).

En el contexto de la presente invención, el término “amatoxina” incluye todos los péptidos cíclicos compuestos por 8 aminoácidos tal como se aislaron a partir del género *Amanita* y descritos en Wieland, T. y Faulstich H. (Wieland T, Faulstich H., CRC Crit Rev Biochem. Dic. de 1978; 5(3):185-260), y además incluye todos los derivados químicos de los mismos; además todos los análogos semisintéticos de los mismos; además todos los análogos sintéticos de los mismos construidos a partir de elementos estructurales según la estructura madre de los compuestos naturales (cíclicos, 8 aminoácidos), además todos los análogos sintéticos o semisintéticos que contienen aminoácidos no hidroxilados en vez de los aminoácidos hidroxilados, además todos los análogos sintéticos o semisintéticos, en los que el resto de sulfóxido de tioéter se reemplaza por un sulfuro, una sulfona o por átomos diferentes de azufre, por ejemplo, un átomo de carbono como un carba-análogo de amanitina, en cada caso en el que cualquier derivado o análogo de este tipo es funcionalmente activo inhibiendo ARN-polimerasa II de mamíferos.

Funcionalmente, las amatoxinas se definen como péptidos o depsipéptidos que inhiben ARN-polimerasa II de mamíferos. Amatoxinas preferidas son aquellas con un grupo funcional (por ejemplo, un grupo carboxílico, un grupo amino, un grupo hidroxilo, un tiol o un grupo de captura de tiol) que pueden hacerse reaccionar con moléculas de ligador o restos de unión a la diana tal como se definieron anteriormente. Amatoxinas que son en particular adecuadas para los conjugados de la presente invención son α-amanitina, β-amanitina, γ-amanitina, ε-amanitina, amanina, amaninamida, amanulina y ácido amanulínico tal como se muestra en la figura 1 así como sales, derivados químicos, análogos semisintéticos y análogos sintéticos de los mismos. Amatoxinas en particular preferidas para su uso en la presente invención son α-amanitina, β-amanitina y amaninamida.

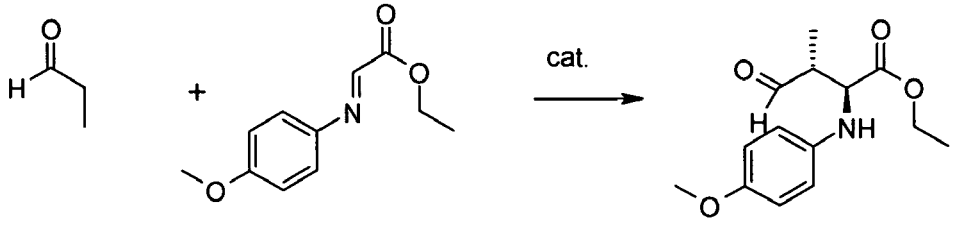
Tal como se usa en el presente documento, un “derivado químico” (o abreviado: un “derivado”) de un compuesto se refiere a especies que tienen una estructura química que es similar a la del compuesto, pero que contiene al menos un grupo químico que no está presente en el compuesto y/o deficiente en al menos un grupo químico que está presente en el compuesto. El compuesto con el que se compara el derivado se conoce como compuesto “original”. Normalmente, un “derivado” puede producirse a partir del compuesto original en una o más etapas de reacción química.

Ejemplos

A continuación, la invención se explica en más detalle mediante ejemplos no limitativos:

Ejemplo 1

Reacción de Mannich usando aldehído propiónico y N-PMP glioxalimina



Una de las características estructurales clave de 1 es la conformación 2S,3R del grupo metilo y amino. Un acceso fácil para la construcción de los estereocentros adyacentes es la reacción de Mannich. Sin embargo, ambos estereocentros producen una reacción de tipo anti-Mannich con alto control diastereomérico y enantiomérico. Esta premisa se describe mediante el uso de un organocatalizador designado descrito fácilmente en J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, 1040-1041. Sin embargo, fallaron diferentes enfoques para eliminar el grupo PMP y dieron mezclas de reacción, de modo que este enfoque se descartó finalmente. Se conoce en la bibliografía que la eliminación puede ser bastante tediosa e insatisfactoria, aunque el grupo PMP es necesario para la reacción.

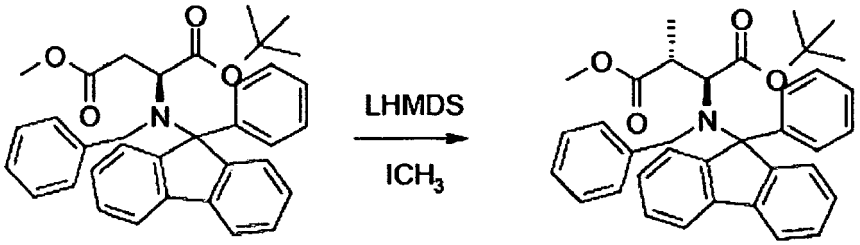
Ejemplo 2

Alquilación de derivado de ácido aspártico

2.1 Introducción

Un enfoque alternativo para sintetizar un sintón de γ,δ-dihidroxiisoleucina con estereoconfiguración correcta (2S,3R,4R) comenzó con derivado 3 de ácido aspártico. Se han descrito enfoques similares en la bibliografía (véase Yoshida *et al.*, A large scale production of (3S,4S)-3-(tert-Butoxycarbonyl)amino-4-methylpyrrolidine and its analogs from L-Aspartic acid, Chem Pharm Bull (1996), 44, 1128 - 1131; Wolf y Rapoport, Conformationally constrained Peptides. Chirospecific Synthesis of 4-AlkylSubstituted g-Lactam-Bridged Dipeptides from L-Aspartic acid', J Org Chem (1989), 54, 3164-3173). Resultó que es extremadamente importante (i) usar una combinación de o bien (ia) un grupo bencilo y un grupo fenilfluorenilo, o bien (ib) dos grupos bencilo, para proteger el grupo amino libre, y (ii) usar hexametildisilazano de litio (LHMDS) en vez de la sal de potasio correspondiente. Hexametildisilazano de potasio (KHMDS) condujo a la configuración contraria.

2.2 Síntesis del compuesto 2



3 **2**

Se cargó un matraz de fondo redondo de tres bocas con barra agitadora magnética, embudo de goteo y termómetro de temperatura baja con 16,3 mmol, 8,7 g del compuesto 3 (véase el ejemplo 3), disuelto en 150 ml de tetrahidrofurano seco y se enfrió hasta -20ºC. Se añadieron gota a gota 40 ml de una disolución 1,0 M en hexano de hexametildisilazida de litio en el plazo de 15 minutos. La reacción se mantuvo a -20ºC durante 2 horas antes de enfriarse hasta -80ºC. Finalmente se añadieron 12,2 ml, 19,6 mmol, 1,2 eq. de yoduro de metilo. Se permitió que la reacción se calentara lentamente y se mantuvo durante 4 horas adicionales a -20ºC. La reacción se extinguió finalmente por adición de 10 ml de metanol, se permitió que se enfriara hasta temperatura ambiente y se vertió en 150 ml agua. Se extrajo la fase acuosa con t-butil metil éter, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a vacío. Producto en bruto: 9,0 g. La ^{1}H-RMN del producto en bruto reveló una pureza diastereoselectiva mejor que 5:1. Rendimiento 7,2 g, 81%.

Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía ultrarrápida, 330 g de sílice, gradiente desde el 0% hasta el 50% de n-hexano/t-butil metil éter. ^{1}H-RMN: d 0,72 (d, 3 H, J = 5,6 Hz), 1,03 (s, 9 H), 2,64 (dt, 1 H, J = 5,6, 8,4 Hz), 3,55 (s, 3 H), 3,85 (d, 1 H, J = 8,4 Hz), 4,31 (d, 1 H, J = 11,2 Hz), 4,65 (d, 1 H, J = 11,2 Hz), 7,15-7,94 (m, 18 H).

2.3 Síntesis del compuesto 2*

De manera análoga al ejemplo 2.2, el compuesto 2* puede sintetizarse a partir de 3*.

Ejemplo 3

Síntesis del compuesto 3

3.1 Introducción

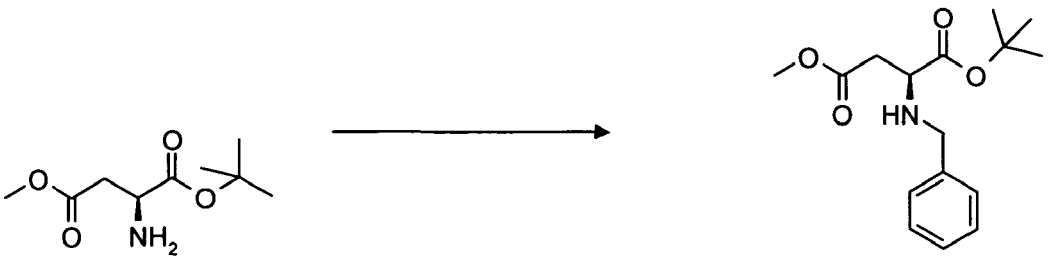
Se sintetizó el compuesto 3 según el protocolo descrito por Dunn *et al.* (Dunn *et al.*, Stereoselective synthesis of 2,3-diaminoacids. 2,3-Diamino-4-phenylbutanoic acid, J. Org. Chem. 55 (1990) 5017-25.

3.2 Síntesis del compuesto B

A **B**

Se colocaron en un cilindro de vidrio de fondo redondo con un tapón de rosca y barra agitadora 25 g, 136 mmol de clorhidrato de 4-metil-L-aspartato. Se suspendió el monoéster A en 100 ml de dioxano/tetrahidrofurano (1:1, v/v) y 25 ml de ácido sulfúrico y se enfrió hasta -30ºC (criostato). Se condensó 2-metilpropeno, 200 g, 3,56 mol. Se cerró el cilindro y se permitió que se calentara hasta temperatura ambiente. Se vertió la mezcla de reacción en 1000 ml de disolución de bicarbonato de sodio saturada y se extrajo con acetato de etilo (5 veces 400 ml). Se secó la fase orgánica combinada sobre $MgSO_4$ y se concentró a vacío. Rendimiento: 17,88 g, 64,6%.

3.3 Síntesis del compuesto C

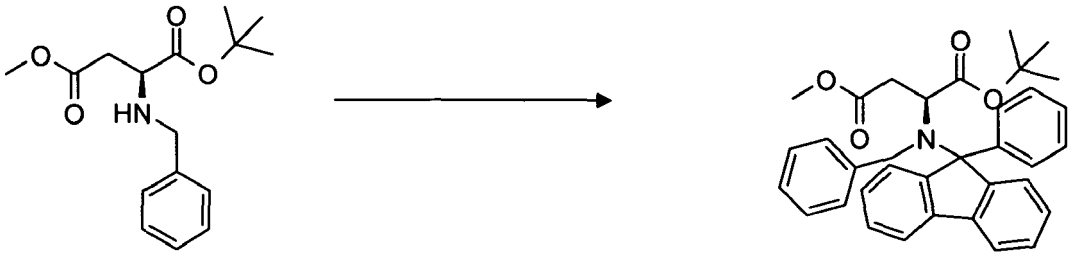


B **C**

Se cargó un matraz de fondo redondo con termómetro y barra agitadora con 17,9 g, 87,9 mmol de B, se disolvieron en 500 ml de metanol y 150 ml de ácido acético. Se añadieron gota a gota 16,0 ml, 158 mmol de benzaldehído. Se mantuvo la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas y finalmente se enfrió hasta 0ºC. Se añadieron 10,0 g, 159 mmol de cianoborohidruro de sodio en el plazo de 45 min y se agitó durante 15 min adicionales a 0ºC. La mezcla de reacción se vertió finalmente en 1000 ml de bicarbonato de sodio y se agitó durante 10 minutos. Tras la extracción con diclorometano (5 veces 250 ml), se secaron las fases orgánicas combinadas sobre $MgSO_4$ y se concentraron a vacío. Producto en bruto: 35 g. Rendimiento 14,3 g, 55,4%.

Purificación cromatográfica ultrarrápida, 330 g de SiO_2, gradiente del 0 al 50% de n-hexano/acetato de etilo. ^{1}H-RMN: d 1,42 (s, 9 H), 2,29 (s, 1 H), 2,62 (t, 2 H, J = 9,2 Hz), 2,50 (t, 1 H, J = 8 Hz), 3,62 (s, 3 H), 3,67 (d, 1 H, 17,6 Hz), 3,83 (d, 1 H, J = 17,2 Hz), 7,19 - 7,30 (m, 5 H).

3.4 Síntesis del compuesto 3



C 3

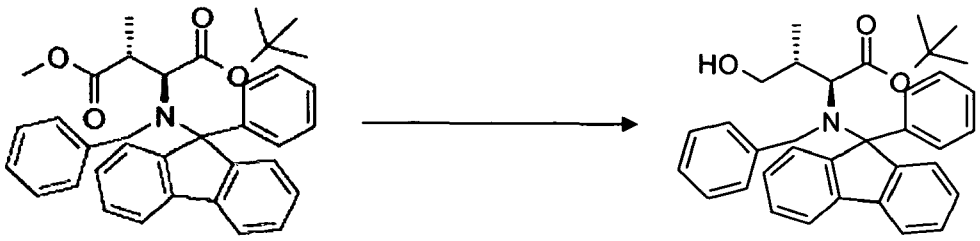
Se cargó un matraz de fondo redondo con barra agitadora con 21,3 g, 51,6 mmol de C, en 500 ml de acetonitrilo. Se añadieron 25,0 g, 77,8 mmol de 9-bromo-9-fenilfluoreno, 20,0 g, 60,3 mmol de nitrato de plomo, 31,7 g, 149,3 mmol de K_3PO_4. Se mantuvo la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2,0 h. Tras la finalización, se diluyó la reacción con 500 ml de diclorometano, se secó sobre Na_2SO_4 y se filtró sobre Celite. Se concentró el producto a vacío. Rendimiento: 16,2 g, 41,7%.

Purificación cromatográfica ultrarrápida, 330 g de SiO_2, gradiente del 0 al 50% de n-hexano/t-butil metil éter. ^{1}H-RMN: d 1,14 (s, 9 H), 1,92 (dd, 1 H, J = 2,8, 16 Hz), 2,54 (dd, 1 H, 10,8, 15,8 Hz), 3,40 (s, 3 H), 3,86 (d, 1 H, J = 13,6 Hz), 4,21 (d, 1 H, J = 14 Hz), 7,17 - 7,83 (m, 18 H).

Ejemplo 4

Síntesis del compuesto 6

4.1 Síntesis del compuesto D



2 D

Se cargó un matraz de fondo redondo equipado con barra agitadora, termómetro y embudo de goteo con 16,4 g, 29,9 mmol de 2, se disolvió en 150 ml de tetrahidrofurano seco y se enfrió hasta -30ºC. Se añadió una disolución de hidruro de diisobutilaluminio 1,0 M (150 ml) bajo una atmósfera inerte (argón) en el plazo de 1,0 horas y se agitó durante 16 horas adicionales. Se hidrolizó la reacción con Na_2SO_4 decahidratado y se permitió que se calentara hasta temperatura ambiente. Se separó el precipitado por filtración y se lavó a fondo con t-butil metil éter. Se concentró la fase orgánica a vacío. Rendimiento: 14,3 g, 92%.

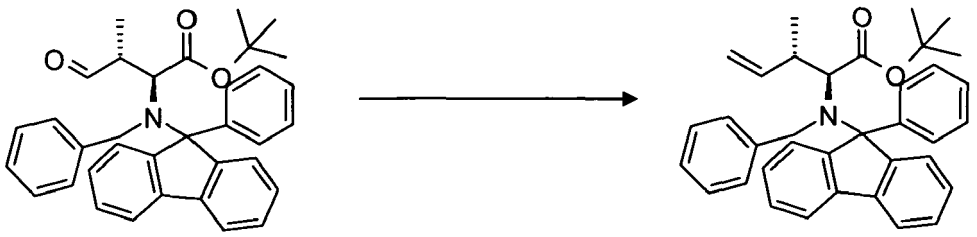
Purificación cromatográfica ultrarrápida, 330 g de SiO_2, gradiente del 0 al 50% de n-hexano/acetato de etilo. ^{1}H-RMN: d 0,45 (d, 3 H, J = 6,8 Hz), 1,02 (s, 9 H), 3,09 (d, 1 H, J = 10,8 Hz), 3,34 (dq, 1 H, J = 7,2 Hz, J = 14,8 Hz), 4,00 (d, 2 H, J = 10,8 Hz), 4,36 (d, 1 H, 13,6 Hz), 4,73 (d, 1 H, J = 13,6 Hz), 7,20 - 7,76 (m, 18 H).

4.2 Síntesis del compuesto E

D E

Se cargó un matraz de fondo redondo equipado con barra agitadora, termómetro, embudo de goteo y entrada de argón con 3,28 ml, 35,5 mmol de cloruro de oxalilo en diclorometano y se enfrió hasta -80ºC. Se añadieron lentamente 5,47 ml, 71,1 mmol de dimetilsulfóxido seco diluido con 20 ml de diclorometano. Se añadieron 13,67 g, 25,9 mmol de compuesto D disuelto en 30 ml de diclorometano, a lo largo de un periodo de 15 minutos. Tras 15 min adicionales a -80ºC, se añadió trietilamina y se permitió que la reacción se calentara hasta temperatura ambiente. Se separaron ambas fases y se extrajo la acuosa con diclorometano (4 veces 150 ml). Se secaron las fases orgánicas combinadas sobre $MgSO_4$, y se concentraron a vacío. Producto en bruto: 16,9 g. El producto en bruto se convirtió directamente en la olefina.

4.3 Síntesis del compuesto 4

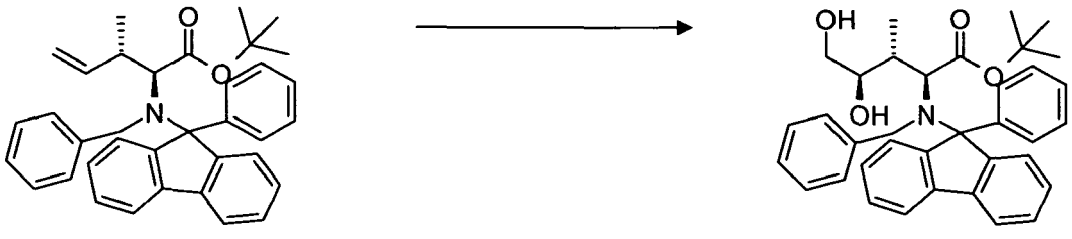


E 4

Se cargó un matraz de fondo redondo con barra agitadora, termómetro y entrada de argón con 2,32 g, 57,9 mmol de hidruro de sodio suspendido en 120 ml de dimetilsulfóxido. Se calentó la suspensión hasta 50ºC durante 30 minutos y se enfrió hasta temperatura ambiente. Entonces se añadió bromuro de metiltrifenilfosfonio sólido y se agitó durante 15 minutos. Se añadió el producto en bruto E, disuelto en 20 ml de dimetilsulfóxido, y se agitó durante 16 horas adicionales. Tras hidrólisis (300 ml de agua), extracción con acetato de etilo (4 veces 150 ml), lavado a fondo de la fase orgánica combinada con agua (3 veces 150 ml) y salmuera, se secó la disolución con $MgSO_4$ y se concentró a vacío. Rendimiento: 13,3 g, 99,2% (2 etapas).

Purificación cromatográfica ultrarrápida, 330 g de SiO_2 gradiente del 0 al 80% de n-hexano/acetato de etilo. ^{1}H-RMN: d 0,51 (d, 3 H, J = 1,6 Hz), 1,05 (s, 9 H), 2,14 (hept, 1 H, J = 0,8 Hz), 3,15 (d, 1 H, 10,8 Hz), 4,30 (d, 1 H, J = 14 Hz), 4,49 (dd, 1 H, J = 1,2, 17,6 Hz), 4,57 (d, 1 H, 13,6 Hz), 5,03 (d, 1 H, J = 0,8, 10,8 Hz), 5,95 (m, 1 H), 7,26 - 7,60 (m, 18 H).

4.4 Síntesis del compuesto F



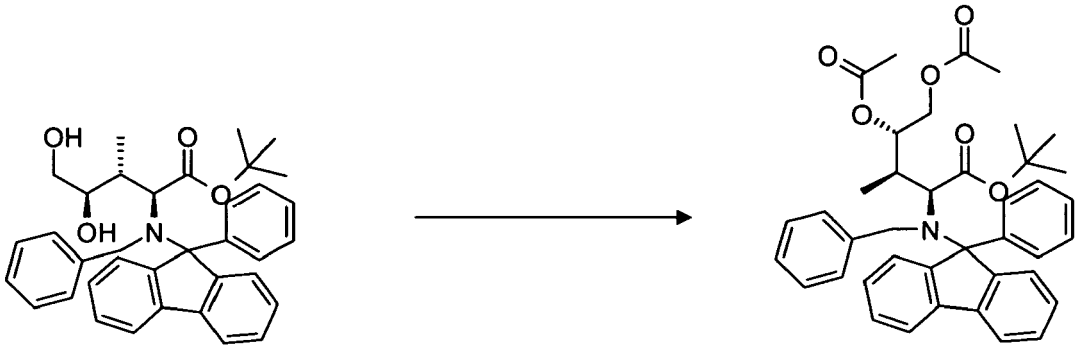
5 F

Se cargó un matraz de fondo redondo con 100 g de mezcla AD (beta, fuente comercial) y se disolvió en 60 ml de t-

butanol/agua (1:1, v/v). Se añadieron en una porción 3,75 g, 7,3 mmol del compuesto 5 disuelto en 17 ml de dioxano. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 4 días hasta la finalización de la reacción. Se extinguió la reacción por adición de Na_2SO_3 y se extrajo con acetato de etilo (4 veces 50 ml), se lavó con NH_4Cl saturado y salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró a vacío. Rendimiento: 1,19 g, 29%.

Purificación cromatográfica ultrarrápida, 330 g de SiO_2, gradiente del 0 al 80% de diclorometano/t-butil metil éter. ^{1}H-RMN: d 0,38 (D, 3 H, J = 6,8 Hz), 1,03 (s, 9 H), 1,84 (s + m, 2 H, J = 8,8 Hz), 3,24 (dd, 1 H, J = 4,8, 11,4 Hz), 3,38 (d, 2 H, J = 10,9 Hz), 3,76 (m, 1 H), 4,40 (d, 1 H, J = 13,3 Hz), 4,95 (d, 1 H, J = 13,3 Hz), 5,55 (s, 1 H), 7,26 - 7,91 (m, 18 H).

4.4 Síntesis del compuesto 5

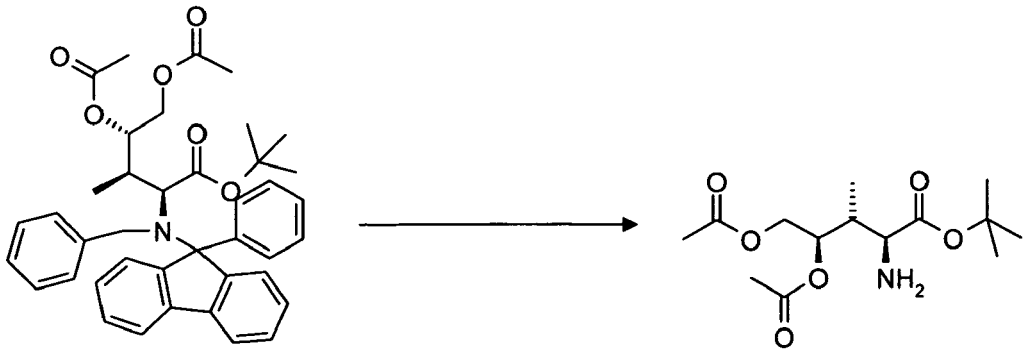


F **5**

Se cargó un matraz de fondo redondo con una barra agitadora magnética con 2,1 g, 3,64 mmol de F, disuelto en 75 ml de diclorometano. Se añadieron 5,0 ml, 52,3 mmol de anhídrido de ácido acético en exceso y cantidades catalíticas de dimetilaminopiridina. Se permitió que la reacción se agitara a temperatura ambiente durante la noche. Rendimiento: 1,83 g, 81%.

Purificación cromatográfica ultrarrápida, 330 g de SiO_2 gradiente del 0 al 20% de hexano/t-butil metil éter. ^{1}H-RMN: d 0,49 (d, 3 H, J = 7,2 Hz), 1,05 (s, 9 H), 1,74 (m, 1 H, J = 2,90 Hz), 1,88 (s, 3 H), 2,11 (s, 3 H), 3,18 (d, 1 H, J = 10,5 Hz), 3,60 (dd, 1 H, J = 2,3, 12,2 Hz), 4,32 (d, 1 H, J = 13,9 Hz), 4,74 (d, 1 H, J = 13,9 Hz), 5,98 (dd, 1 H, J = 2,4, 84 Hz), 7,10 - 7,73 (m, 18 H).

4.4 Síntesis del compuesto 6



5 **6**

Se cargó un matraz de fondo redondo equipado con una entrada de argón y colector de vacío con 2,0 g, 3,1 mmol de 5 disuelto en 50 ml de ácido clorhídrico 0,1 M en etanol y 200 mg de paladio al 10% sobre carbón. Tras purgar el matraz con hidrógeno, se permitió que la reacción se agitara durante 16 horas a temperatura ambiente. Se purgó el matraz con argón, se filtró y se concentró el filtrado a vacío. Se trató el aceite transparente con n-hexano (3 veces) para eliminar el fenilfluoreno. Se obtuvo una sal de clorhidrato de 6 como un sólido blanco. Rendimiento: 0,92 g, 98%.

Purificación ,mediante precipitación o cromatografía. ^{1}H-RMN: (isómero principal) d 1,16 (d, 3 H, J = 6,8 Hz), 1,47 (S, 9 H), 2,06 (s, 3 H), 2,09 (s, 3 H), 2,78 (m, 1 H, J = 7,7 Hz), 4,04 (dd, 1 H, J = 3,9, 12,5 Hz), 4,15 (s, 1 H), 4,52 (dd, 2 H, J = 2,08, 12,6 Hz), 5,02 (m, 2 H), 8,86 (s, 2 H). ^{13}C-RMN: (isómero principal) d 11,5, 20,8, 21,7, 35,0, 53,9, 62,4,

72,2, 84,9, 166,2, 169,9, 170,7.

Ejemplo 5

Síntesis de α-amatoxina

5.1 Síntesis del compuesto G

Se cargó un tubo de reacción de polipropileno de recipiente abierto equipado con una frita y válvula de drenaje con 0,5 g, 0,5 mmol de tetrahidropiranil-poliestireno FmocHypOH y se permitió que se hinchara en 3,0 ml de dimetilformamida durante 20 minutos. Tras la eliminación del disolvente a través de la válvula de drenaje, se cargó el recipiente de reacción con 179 mg, 0,6 mmol de 6, disuelto en 1,5 ml de dimetilformamida, 1,5 ml de una disolución de hidroxibenzotiazol 1 mM en dimetilformamida, 1,5 ml de una disolución de hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinfosfonio 1 mM en dimetilformamida y 259 µl de diisopropiletilamina. Tras la homogeneización con una barra de vidrio se calentó la reacción asistida por microondas hasta 70ºC durante 4,0 minutos y se lavó finalmente con dimetilformamida (3 veces) y diclorometano (2 veces).

Se escindió una alícuota, aproximadamente 20 mg del polímero, con ácido trifluoroacético/agua/trietilsilano (8:2:10; v/v/v) para análisis por espectroscopía de masas. EM: 582,92; $[M-^{t}Bu+H]^{+}$; Fmoc-Hyp-bis(O-acetil)dihidroxi-Ile-O^{t}Bu

5.2 Síntesis del compuesto H

Se desprotegió entonces el compuesto G con Fmoc de manera iterativa y se acopló con los 6 aminoácidos restantes tal como sigue:

Desprotección de N con Fmoc:

Se trató dos veces la resina con 4,5 ml de una disolución de piperidina al 20% en dimetilformamida y se calentó hasta 70ºC durante 3 minutos asistida por microondas. Entonces se lavó la resina con dimetilformamida (3 veces).

Acoplamiento de aminoácidos:

Se hizo reaccionar con éxito un péptido unido a resina desprotegido en 1,5 ml de dimetilformamida con aminoácidos (véase la lista) disueltos en 1,5 ml de dimetilformamida, 1,5 ml de una disolución de hidroxibenzotiazol 1 mM en dimetilformamida, 1,5 ml de una disolución de hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinfosfonio 1 mM en dimetilformamida y 259 µl de diisopropiletilamina. Tras la homogeneización con una barra de vidrio se calentó la reacción asistida por microondas hasta 70ºC durante 4,0 minutos y se lavó finalmente con dimetilformamida (3 veces) y diclorometano (2 veces).

Se escindió una alícuota, aproximadamente 20 mg del polímero, con ácido trifluoroacético/agua/trietilsilano (8:2:10; v/v/v) para análisis por espectroscopía de masas.

Aminoácidos que van a acoplarse:

1. Fmoc-(N-Tri)Asn OH

2. Fmoc-Cys(S-2-((o-NO_2Ph)SO_2Trp-O-alil))]OH

3. Fmoc-Gly OH

4. Fmoc-Ile OH

5. Fmoc-Gly OH

EM: 1227,14; $[M-^{t}Bu+H]^{+}$; 1283,00; $[M+H]^{+}$; FmocCys(S-2-((o-NO_2Ph)SO_2Trp-O-alil))]-Asn-Hyp-bis(O-acetil)dihidroxi-Ile-O^{t}Bu.

EM: 1453,98; $[M-^{t}Bu+H]^{+}$; $[M+H]^{+}$; FmocGly-Ile-Gly-Cys(S-2-((o-NO_2Ph)SO_2Trp-O-alil))]-Asn-Hyp-bis(O-acetil)dihidroxi-Ile-O^{t}Bu

5.3 Síntesis del compuesto I; cierre del anillo B

Se desprotegió con éxito la resina H con alilo y Fmoc antes de la ciclación del anillo B:

Desprotección de O-alilo

Se agitó la resina durante la noche a temperatura ambiente con 874 mg, 5,6 mmol de ácido N,N-dimetilbarbitúrico, 258 mg, 0,224 mmol de $Pd(PPh_3)_4$ en diclorometano. Se lavó la resina tras 16 horas con diclorometano; dimetilformamida; acetonitrilo; y t-butil metil éter.

Desprotección de N con Fmoc:

Se trató dos veces la resina con 4,5 ml de una disolución de piperidina al 20% en dimetilformamida y se calentó hasta 70ºC durante 3 minutos asistida por microondas. Entonces se lavó la resina con dimetilformamida (3 veces).

Formación del anillo B

Se hizo reaccionar un péptido unido a resina desprotegido en 3,0 ml dimetilformamida con 1,5 ml de una disolución de hidroxibenzotiazol 1 mM en dimetilformamida, 1,5 ml de una disolución de hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinfosfonio 1 mM en dimetilformamida y 259 µl de diisopropiletilamina. Tras la homogeneización con una barra de vidrio se calentó la reacción asistida por microondas hasta 70ºC durante 4,0 minutos y se lavó finalmente con dimetilformamida (3 veces) y diclorometano (2 veces).

Se escindió una alícuota, aproximadamente 20 mg del polímero, con ácido trifluoroacético/agua/trietilsilano (8:2:10; v/v/v) para análisis por espectroscopía de masas. EM: 1174,08; $[M-{}^tBu+H]^+$; 1229,96; $[M+H]^+$; [Gly-Ile-Gly-Cys(S-2-((o-NO_2Ph)SO_2**Trp**))]anillo-Asn-Hyp-bis(O-acetil)dihidroxi-Ile-O^{t}Bu

5.4 Desprotección de N con 2-NO_2-fenilsulfonilo y separación de la resina, compuesto J

Se desprotegió la resina I con 2-NO_2-fenilsulfonilo y se escindió finalmente a partir de la resina.

Desprotección de N con 2-NO_2-fenilsulfonilo:

Se trató repetidamente (3 veces) la resina con 500 µl de mercaptoetanol y 500 µl de diazabicicloundeceno en 4 ml de dimetilformamida durante 2 horas. Entonces se lavó la resina intensamente con dimetilfomamida, diclorometano, acetonitrilo y t-butil metil éter.

Separación de la resina:

Se trató entonces la resina con 6 ml de ácido trifluoroacético/agua/trietilsilano (8:2:10; v/v/v) a temperatura ambiente durante la noche y se concentró a vacío la proteína en bruto.

EM: 989,18; $[M-{}^tBu+H]^+$; [**Gly**-Ile-Gly-Cys(S-2-(**Trp**))]anillo-Asn-Hyp-bis(O-acetil)dihidroxi-Ile-O^{t}Bu

5.5 Síntesis del compuesto K; formación del anillo A

Se disolvió el producto en bruto J en un matraz de reacción con barra agitadora en 25 ml de dimetilformamida. A la disolución se le añadieron 85 µl, 2,5 mmol de diisopropiletilamina y 135 ml, 2,5 mmol de difenilfosfacida. Se permitió que la mezcla de reacción se agitara durante la noche a temperatura ambiente. La disolución se concentró finalmente a vacío, se disolvió en 0,5 ml de metanol y se purificó. Rendimiento: 4,9 mg.

Se purificó la mezcla de reacción en bruto mediante cromatografía en columna preparativa. EM: 858,94; $[M+H]^+$

Ejemplo 6

Síntesis del compuesto 3*

De manera análoga al ejemplo 3.4, puede sintetizarse el compuesto 3* a partir del compuesto C usando bromuro de bencilo en vez de 9-bromo-9-fenilfluoreno para la protección de N.

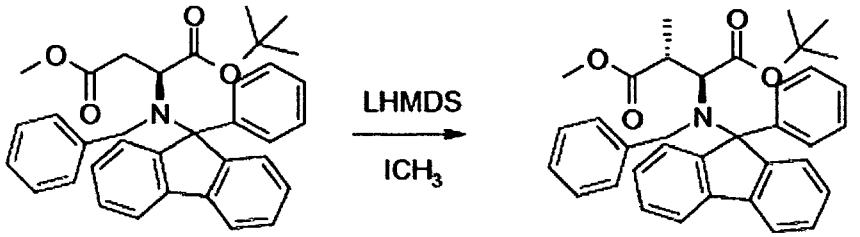
Ejemplo 7

Síntesis alternativa del compuesto 6

De manera análoga al ejemplo 4, puede sintetizarse el compuesto 6 a partir del compuesto 2* mediante los compuestos intermedios D*, E*, 4*, F* y 5* (teniendo cada uno un segundo grupo de protección de bencilo en el átomo de nitrógeno en vez del grupo fenilfluorenilo en el compuesto correspondiente D, E, 4, F y 5, respectivamente).

REIVINDICACIONES

1. Método para la síntesis de γ,δ-dihidroxiisoleucina 1 o de un sintón para el compuesto 1, que comprende la etapa de metilar el compuesto 3 o 3* con yoduro de metilo en presencia de bis(trimetilsilil)amida de litio (LHMDS)



3 2

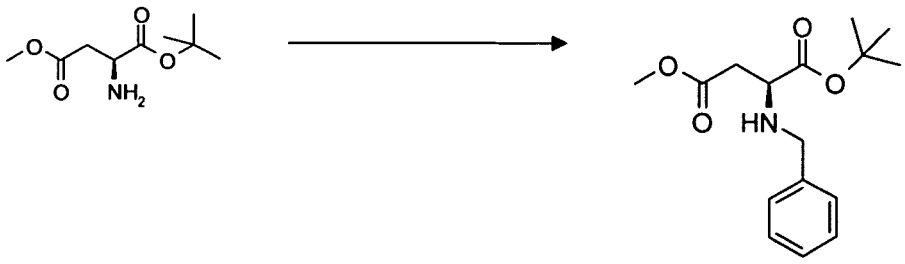
2. Método según la reivindicación 1, en el que la reacción se realiza a una temperatura de entre aproximadamente -10ºC y aproximadamente -80ºC en un éter durante entre aproximadamente 12 y aproximadamente 20 horas.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además una o más de las siguientes etapas:

(a) reacción de éster monometílico de ácido L-aspártico A con 2-metilpropeno para crear el compuesto B;

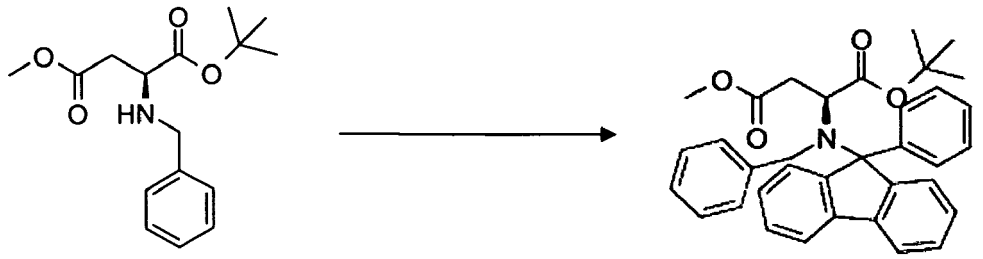
A B

(b) reacción de B con benzaldehído para crear el compuesto C;



B C

(c) reacción de C con bromuro de fenilfluorenilo para crear el compuesto 3, o con bromuro de bencilo para crear el compuesto 3*



C 3

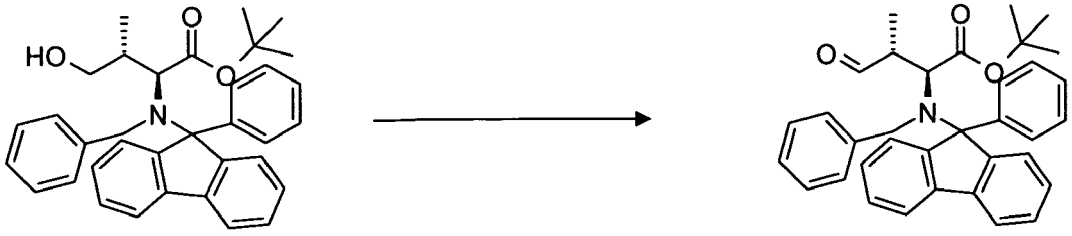
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una o más de las siguientes etapas:

(a) reducción del compuesto 2 o compuesto 2*, en particular con hidruro de diisobutilaluminio para crear el

compuesto D o D*, respectivamente;

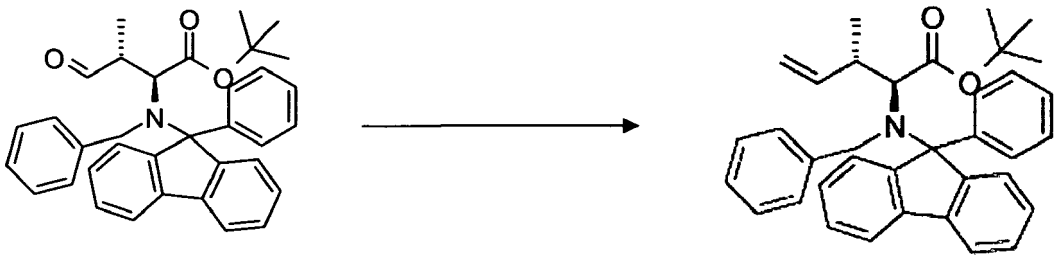
2 D

(b) oxidación del compuesto de hidroxilo D o D*, en particular usando una oxidación de Swern, para crear el compuesto E o E*, respectivamente;



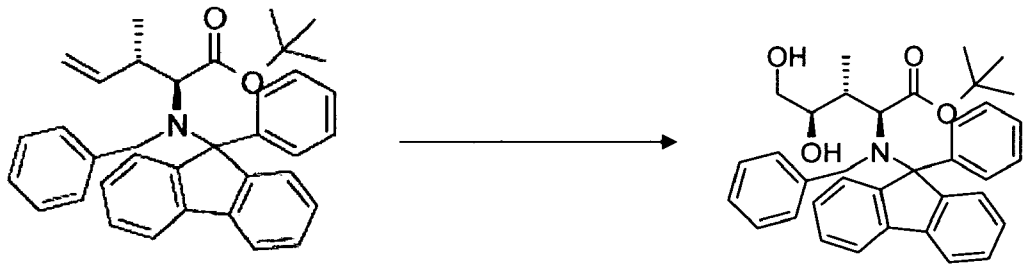
D E

(c) conversión de E o E*, en particular en condiciones de una reacción de Wittig, para crear el compuesto 4 o 4*, respectivamente;



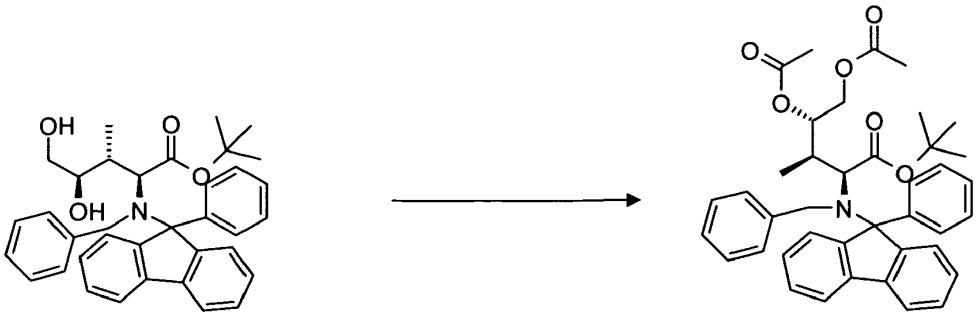
E 4

(d) conversión de 4 o 4*, en particular en condiciones de una oxidación de Sharpless, para crear el compuesto F o F*, respectivamente;



4 F

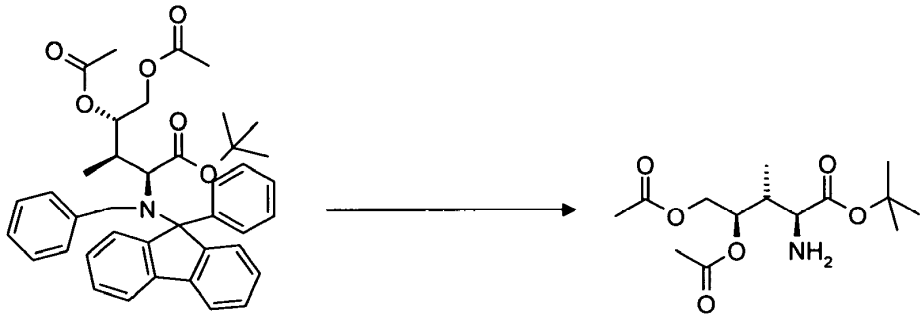
(e) conversión de F o F*, en particular en condiciones de esterificación catalíticas, para crear el compuesto 5 o 5*, respectivamente;



F 5

y

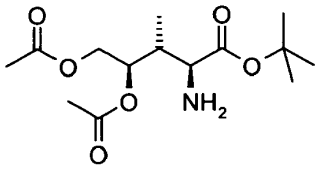
(f) desprotección de N de 5 o 5*, en particular usando hidrogenación catalizada por paladio, para crear el compuesto 6



5 6 .

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además la etapa de aislar y purificar el compuesto 6, en particular en el que el compuesto 6 se purifica como clorhidrato usando precipitación y/o purificación cromatográfica.

6. Compuesto de estructura 6:



6 .

7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que el compuesto tiene una pureza mayor del 90%, en particular mayor del 95%.

8. Compuesto según la reivindicación 6, en el que el compuesto 6 tiene una pureza diastereomérica mayor de 70:30.

9. Kit que comprende el compuesto 6, en particular que comprende al menos 100 mg del compuesto 6, y uno o más reactivos adicionales para la síntesis de amatoxinas o precursores de las mismas.

10. Kit según la reivindicación 9, en el que dichos uno o más reactivos adicionales se seleccionan de la lista de:

(i) una resina, en particular una resina seleccionada del grupo de: una resina de Merrifield; una resina de amida de Rink; y una resina de THP;

(ii) una hidroxiprolina protegida, en particular O-alil-hidroxiprolina protegida con fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) (FmocHypOAll);

(iii) una asparagina protegida, en particular N-tritil-asparagina protegida con Fmoc (Fmoc(N-Tri)AsnOH);

(iv) un dipéptido Cys-Trp protegido, en particular dipéptido Cys-Trp protegido con Fmoc con grupos de protección de -SH y -OH (FmocCys(S-2-((o-NO_2Ph)SO_2Trp-O-alil))]OH);

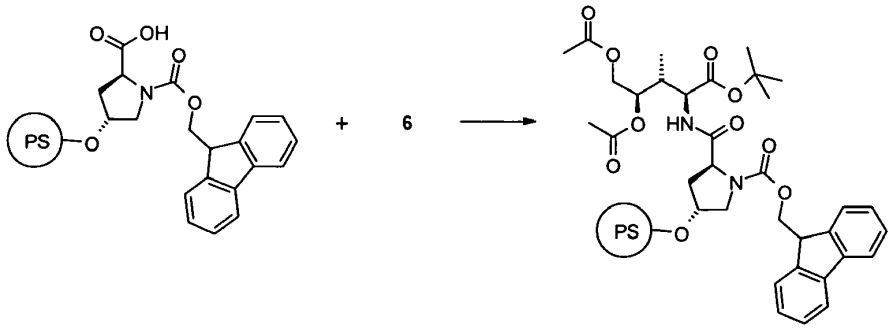
(v) una glicina protegida, en particular glicina protegida con Fmoc (FmocGly);

(vi) una isoleucina protegida, en particular isoleucina protegida con Fmoc (FmocIle);

(vii) un reactivo de acoplamiento peptídico, en particular un reactivo de acoplamiento peptídico seleccionado del grupo de: tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU); hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP); y hexafluorofosfato de o-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU); y

(viii) una amina terciaria, en particular N,N-diisopropiletilamina (DiPEA).

11. Método para sintetizar una amatoxina, o molécula precursora para la misma, que comprende la etapa de (a) acoplar el compuesto 6 a hidroxiprolina, haciendo reaccionar en particular el compuesto 6 con una resina precargada con hidroxiprolina, acoplando en particular el compuesto 6 al extremo terminal C libre de FmocHypOH inmovilizado sobre una resina L, en particular una resina de tetrahidropiranilo (THP)

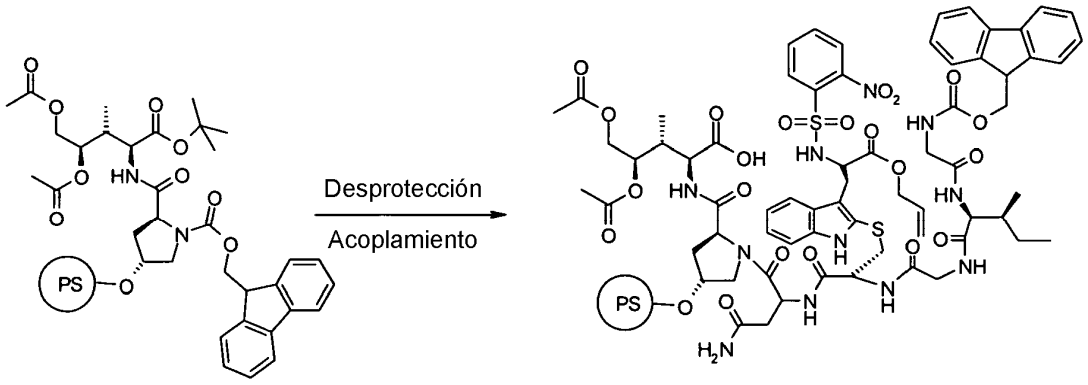


L G .

12. Método según la reivindicación 11, en el que los aminoácidos restantes se acoplan entonces mediante una estrategia de síntesis N-terminal.

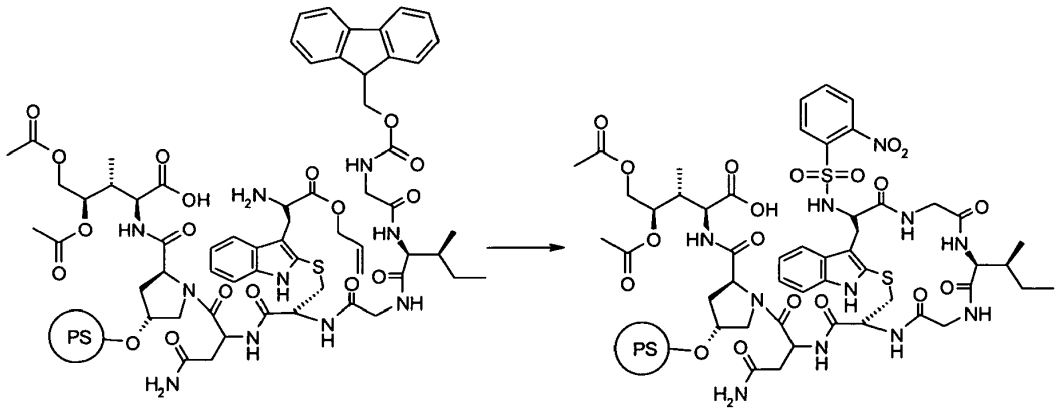
13. Método según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente una o más de las siguientes etapas:

(b) desprotección de N con Fmoc iterativa y acoplamiento de G con Fmoc-(N-Tri)Asn OH; FmocCys(S-2-((o-NO_2Ph)SO_2Trp-O-alil))]OH, Fmoc-Gly OH, Fmoc-Ile OH, Fmoc-Gly OH para crear el compuesto H:



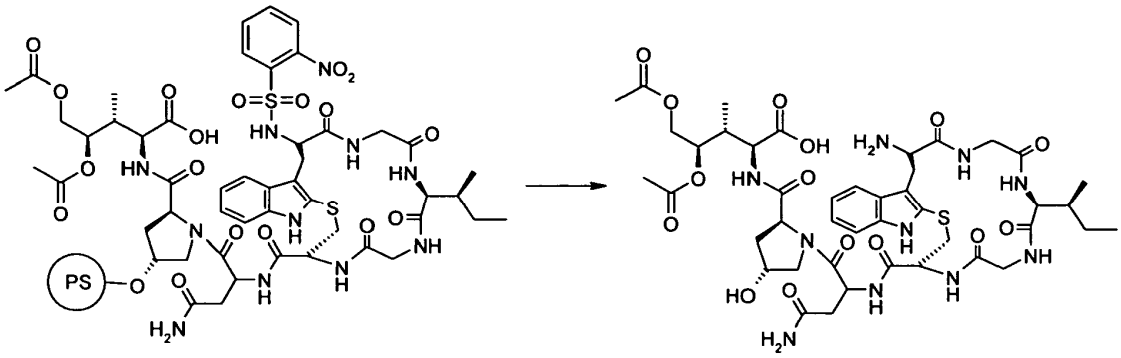
G H

(c) desprotección de O-alilo y N con Fmoc de H seguido por ciclación para crear el compuesto I (cierre del anillo B):



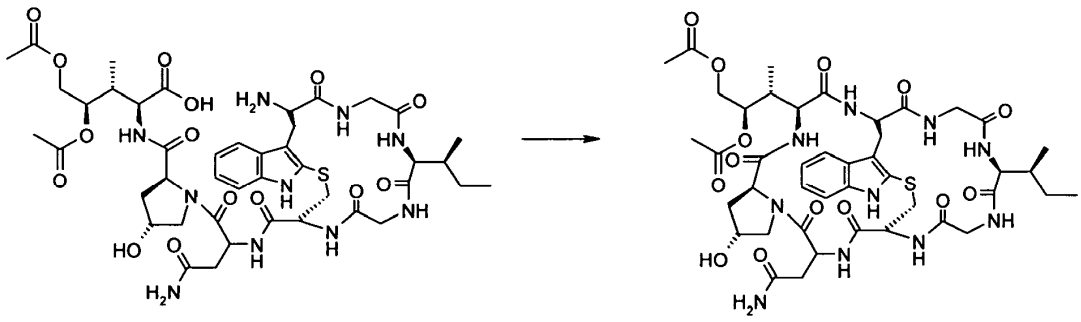
H I

(d) desprotección de N con 2-nitro-arilsulfonamida y separación de I de la resina para crear el compuesto J:



I J

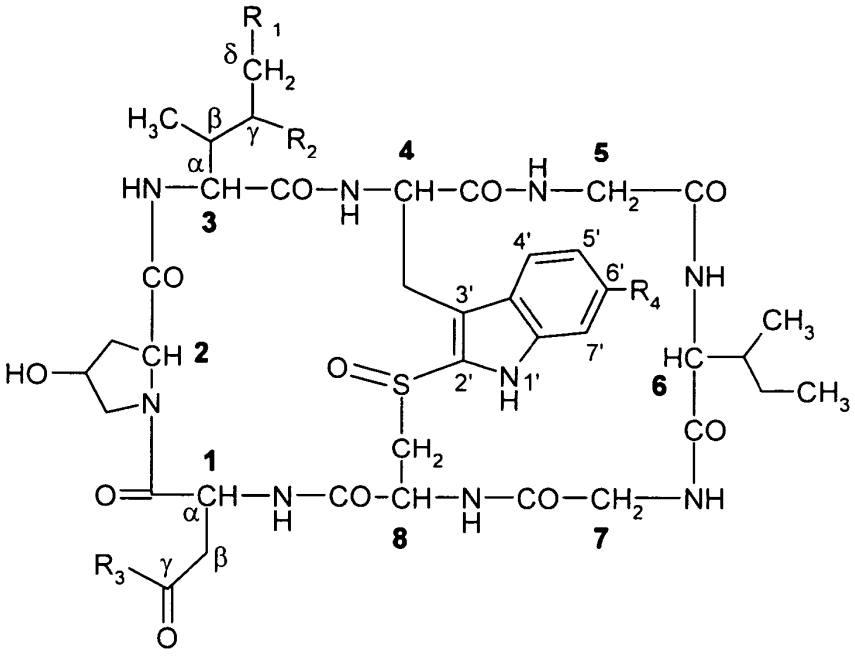
(e) ciclación en fase de disolución de J creando un derivado de amanitina K:



J K

14. Método según la reivindicación 11, en el que la amatoxina es una amatoxina con un resto de dihidroxiisoleucina como aminoácido 3.

Figura 1



	R_1	R_2	R_3	R_4
α-amanitina	OH	OH	NH_2	OH
β-amanitina	OH	OH	OH	OH
γ-amanitina	H	OH	NH_2	OH
ε- amanitina	H	OH	OH	OH
amanina	OH	OH	OH	H
amaninamida	OH	OH	NH_2	H
amanulina	H	H	NH_2	OH
ácido amanulínico	H	H	OH	OH

Figura 2

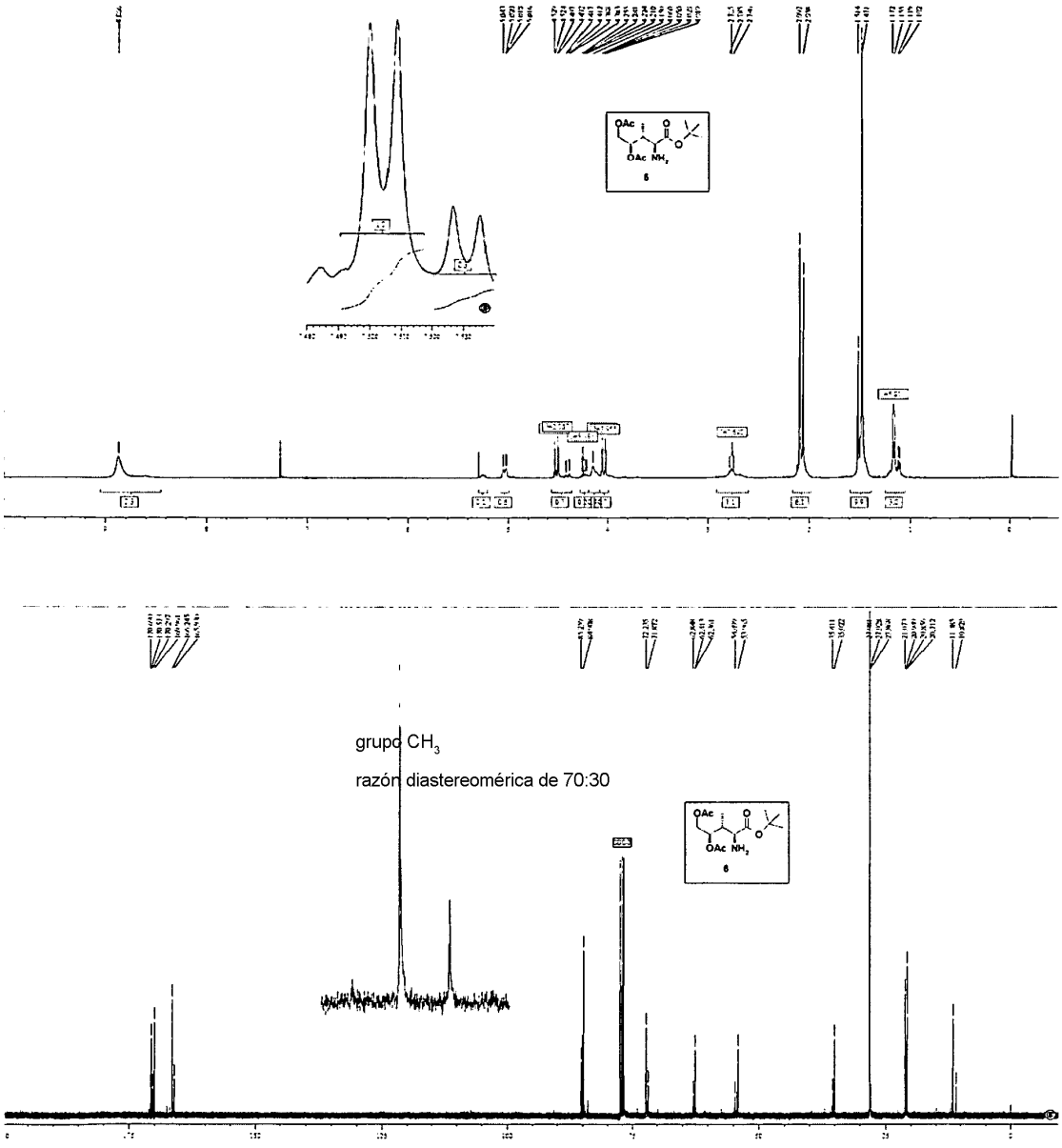
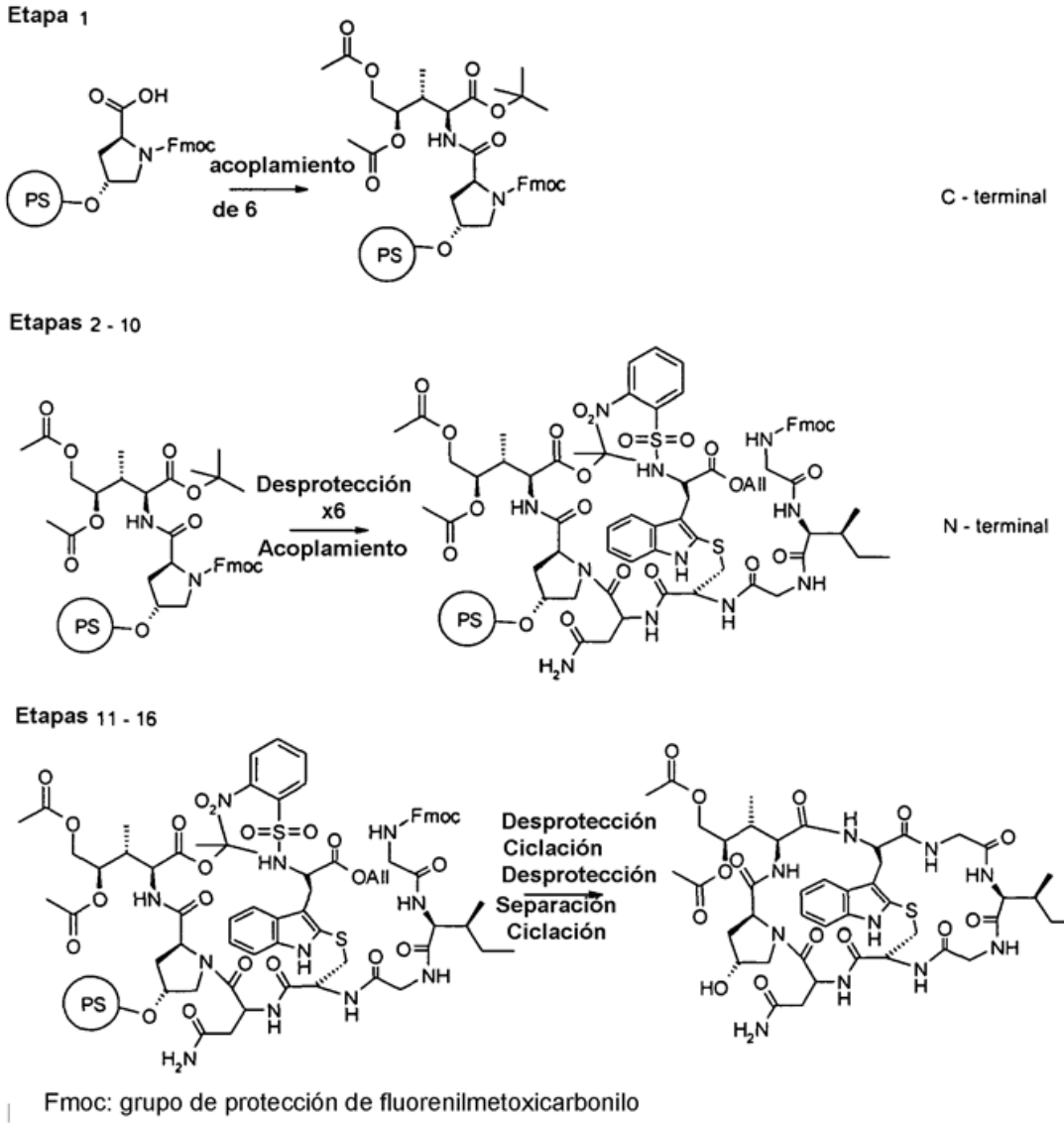


Figura 3



Fmoc: grupo de protección de fluorenilmetoxicarbonilo